

2007. – Введ. 01.08.07. – Минск: Белорус. гос. ин-т стандартизации и сертификации, 2011. – 19 с.

11. Аладышева, Ж. И. Практические аспекты работ по валидации аналитических методик/Ж.И. Аладышева, В.В. Беляева, В.В. Береговых // Фармация. – 2008. – № 7. – С. 9–14.

Адрес для корреспонденции:

220141, Республика Беларусь,
г. Минск, ул. Купревича, 5, к. 2,
Институт биоорганической химии НАН Беларуси,
тел./факс (017) 357 87 61,
e-mail: info@iboch.by,
Петров П.Т.

Поступила 27.07.2020 г.

УДК 616.5:615.07

И. В. Семак¹, В. Б. Климашевич², Е. В. Малюшкова¹, Е. О. Корик¹, О. А. Казючиц³,
А. И. Жебентяев⁴

**РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО
ОПРЕДЕЛЕНИЯ РАНОЛАЗИНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА
ДЛЯ ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ**

¹Белорусский государственный университет, г. Минск, Республика Беларусь

²Государственное предприятие «АКАДЕМФАРМ», г. Минск, Республика Беларусь

³СООО «НАТИВИТА», г. Витебск, Республика Беларусь

⁴Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет,
г. Витебск, Республика Беларусь

Разработана методика хромато-масс-спектрометрического определения ранолазина в сыворотке крови с использованием для пробоподготовки твердофазной экстракции на гидрофобном сополимере полистирола и дивинилбензола (Chromabond HR-X) с последующим хроматографическим разделением экстрагированных анализов на колонке со среднеполярной фазой на основе химически модифицированного кремнезема с привитыми цианоалкильными группами (Nucleodur-100-3 CN-RP). Благодаря предложенной схеме твердофазной экстракции достигалась селективность и эффективность выделения ранолазина и минимизировался эффект матрицы при последующем его масс-спектрометрическом детектировании. Сочетание в методике различных механизмов сорбции анализов при пробоподготовке и при хроматографии обеспечило высокую селективность и чувствительность анализа. В качестве внутреннего стандарта впервые предложено использовать карведилол, который, благодаря наличию ряда общих структурных элементов и сходству физико-химических свойств, обеспечивает высокую воспроизводимость и надежность разработанной методики при анализе большого количества биообразцов. Применение карведилола в качестве альтернативы дорогостоящим и малодоступным меченым внутренним стандартам позволяет снизить себестоимость количественного определения ранолазина при проведении масштабных биоэквивалентных испытаний. Методика валидирована в соответствии с международными требованиями и успешно апробирована при исследовании сравнительной биодоступности лекарственных средств, содержащих ранолазин.

Ключевые слова: ранолазин, твердофазная экстракция, хромато-масс-спектрометрическое определение, валидация.

ВВЕДЕНИЕ

Ранолазин относится к эффективным антиангинальным лекарственным средствам (ЛС). Преимуществом ранолазина

по сравнению с другими ЛС антиангинального ряда является отсутствие значимого влияния на частоту сердечных сокращений и артериальное давление [1, 2].

Основным методом определения ранолазина в биологических образцах является высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) с масс-спектрометрическим детектированием с использованием хроматографических колонок с неполярными гидрофобными фазами типа C18 различных брендов Zorbax, Chiralcel OD-H, Gemini, VEN [1–4]. Для большинства представленных в литературе методик нижний предел количественного определения (НПКО) составлял от 4,5 до 10 нг/мл, а время ВЭЖХ анализа превышало 2 мин. В одной из работ описана методика с НПКО, равным 1 нг/мл, однако для пробоподготовки использовался метод осаждения белка ацетонитрилом, что не обеспечивало необходимую чистоту пробоподготовленных образцов [1]. Малая величина НПКО (1 нг/мл) достигалась за счет большого объема вводимой в хроматограф пробы – 3 мкл, что в совокупности с использованным методом для пробоподготовки (осаждение белка ацетонитрилом) повышает вероятность быстрого загрязнения аналитической колонки и масс-спектрометрического детектора с последующей потерей чувствительности и селективности анализа.

Учитывая недостатки имеющихся методик, целью настоящей работы стала разработка специфичной, высокочувствительной и экспрессной методики определения ранолазина в сыворотке крови методом твердофазной экстракции и жидкостной хромато-масс-спектрометрии и ее применение для изучения сравнительной биодоступности лекарственных средств пролонгированного действия, содержащих ранолазин.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Стандартные образцы, реактивы и оборудование. Использованы стандартные образцы ранолазина (Cipla LTD, Индия), карведилола (стандартный образец Европейской фармакопеи). Твердофазную экстракцию проводили при помощи вакуумной системы Baker SPE-12G (J. T. Baker, США), используя сорбционные патроны, заполненные сорбентом на полимерной основе Chromabond HR-X (Macherey-Nagel, Германия). В работе применяли ацетонитрил квалификации для «ВЭЖХ» (AppliChem, Бельгия) и метанол квалифика-

ции для «ВЭЖХ» (Panreac, Испания), все остальные реактивы имели квалификацию «х. ч.» и «ос. ч.». Для приготовления подвижной фазы использовали деионизированную воду (удельное сопротивление более 18 МОм·см), полученную с помощью системы очистки воды Millipore Simplicity UV (Merck Millipore, США).

Аналитическое оборудование. Анализ проводили на жидкостном хроматографе LCMS-8030 (Shimadzu, Япония) со специализированной системой управления, сбора и обработки данных «LabSolutions», оснащенном квадрупольным tandemным масс-спектрометрическим детектором, дегазатором, термостатом колонок, автосамплером с блоком охлаждения образцов (+4 °C) и градиентным насосом, обеспечивающим смешивание четырех растворителей.

Условия хромато-масс-спектрометрического определения. Разделение проводили при температуре 45 °C на аналитической колонке размером 125 мм x 3,0 мм, неподвижная фаза Nucleodur-100-3 CN-RP (Macherey-Nagel, Германия). В качестве подвижной фазы использовали смесь воды, метанола и 0,1% муравьиной кислоты в соотношении 44,3:0,7:55 (по объему) соответственно в изократическом режиме элюирования; расход подвижной фазы составлял 0,9 мл/мин, объем вводимой пробы – 0,2–1 мкл. Возможность использования различных объемов ввода подготовленных проб доказывали при разработке и валидации методики [5, 6]. Масс-спектрометрический анализ проводили, используя положительную электро-распылительную ионизацию в режиме мониторинга множественных реакций (MRM-режим) ранолазина и карведилола. Анализируемые соединения идентифицировали в сканирующем режиме по соотношению масса/заряд (m/z) для молекулярных $[M+H]^+$ ионов по дочерним ионам в MRM режиме, а также по временам удерживания в сравнении со стандартами. Количественное определение ранолазина осуществляли методом внутреннего стандарта, который добавляли в биообразцы до пробоподготовки.

Градуировочный график строили на основании зависимости соотношения площади пика ранолазина к площади пика карведилола ($y = K_s$) от концентрации ранолазина (x , нг/мл). Зависимость значений K_s от концентрации ранолазина описы-

вается уравнением линейной регрессии. Угловой коэффициент линейной регрессии (b) и метрологические характеристики зависимости $y = bx + a$ рассчитывали методом наименьших квадратов с использованием данных всех приемлемых повторных анализов для каждого градуировочного образца в соответствии с рекомендациями следующих руководств: ICH guideline M10 on bioanalytical method validation (EMA), Правила БЭИ в рамках ЕврАзЭС (ЕАЭК) и IUPAC (Guidelines for calibration in analytical chemistry) [7–10].

Биопробы. Образцы крови получали у 35 здоровых добровольцев, которые принимали ЛС перорально в режиме однократного приема натошак в дозе 500 мг ранолазина (1 таблетка). Забор крови осуществлялся медперсоналом при помощи одноразовых шприцев из локтевой вены до приема ЛС и через 0,5; 1; 2; 3; 4; 5; 6; 8; 10; 12; 24; 36 часов. Из цельной крови получали сыворотку стандартным методом – путем центрифугирования в пробирках. Образцы сыворотки крови добровольцев замораживали и хранили в морозильной камере при температуре $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 31 суток.

Для контроля качества испытания готовили образцы сыворотки крови с известными концентрациями ранолазина: 1,5–15,0 нг/мл (нижний уровень концентраций), 150 нг/мл (средний уровень концентраций), 1300 нг/мл (верхний уровень концентраций).

Пробоподготовка. К 0,5 мл сыворотки крови прибавляли 0,2 мл рабочего раствора внутреннего стандарта и 0,5 мл 0,1 М фосфатного буферного раствора (рН 8,5). Смесь интенсивно перемешивали на миншейкере (vortex) в течение 10–20 сек. Супернатант переносили в сорбционный патрон с 50 мг сорбента Chromabond HR-X. Сорбент предварительно промывали 3 мл метанола, 3 мл воды деионизированной и 1 мл 0,1 М фосфатного буферного раствора (рН 8,0). Образец пропускали со скоростью примерно 0,5–1,0 мл/мин, после чего сорбционный патрон последовательно промывали 1 мл 0,1 М фосфатного буферного раствора (рН 8,5), 3 мл воды деионизированной и 0,2 мл 30% водного раствора ацетонитрила. Сорбент высушивали в потоке воздуха под вакуумом в течение 7–10 минут, анализируемое вещество элюировали 1,25 мл элюента (смесь 0,1 М форми-

ат-аммонийного буферного раствора (рН 2,5) и метанола в соотношении 20:80 по объему). Элюат собирали в хроматографические виалы и помещали в термостатируемый автосамплер ($+4\text{ }^{\circ}\text{C}$) для проведения хромато-масс-спектрометрического анализа.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выбор внутреннего стандарта. В случае применения жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии при количественном определении лекарственных веществ в биологических образцах с целью компенсации эффектов матрицы и обеспечения постоянства функции отклика рекомендуется использовать меченные стабильным изотопом аналоги аналита. Из меченых внутренних стандартов самыми доступными (по стоимости и возможности синтеза) являются дейтерированные соединения. Вместе с тем в настоящее время имеются многочисленные публикации, согласно которым меченные дейтерием внутренние стандарты не обеспечивают необходимую точность и достоверность измерений в силу высокой вероятности реакции изотопного обмена между целевым аналитом и его дейтерированным аналогом, в результате чего нарушается постоянство соотношения сигналов аналит/стандарт и линейность градуировочной зависимости [11–21]. Дейтерированные стандарты могут подвергаться дедейтерированию во время пробоподготовки (кислотный гидролиз, твердофазная экстракция), обуславливая тем самым чрезмерную вариабельность измерений. В результате могут изменяться физико-химические свойства вещества. Вследствие этого аналит и его дейтерированный аналог будут по-разному извлекаться из биоматрицы. Такое явление описано для ряда лекарственных веществ [20]. Дейтерирование увеличивает гидрофильность молекулы. В результате может изменяться время удерживания меченого стандарта при обращенно-фазовой ВЭЖХ. Вследствие этого не будет компенсироваться эффект матрицы, что указывается в нормативной документации, регламентирующей валидацию биоаналитических методик [7]. В ряде случаев применяемые с целью устранения эффектов матрицы элюируемые вместе с аналитом меченные дейтерием стандарты могут сами выступать

в качестве причины матричного эффекта, в особенности при низких концентрациях аналита [11–21].

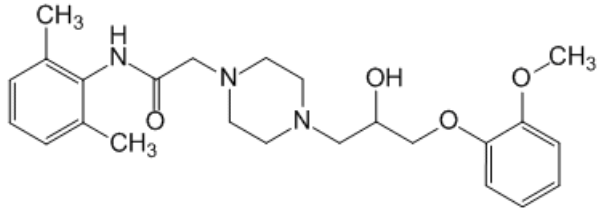
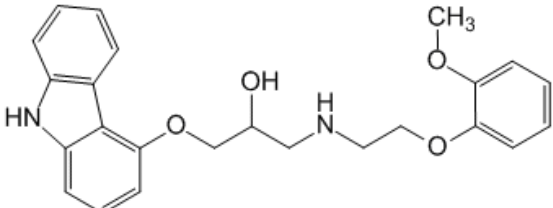
В связи с этим в настоящее время наблюдается тенденция к отказу от дейтерированных внутренних стандартов в пользу стандартов, меченных стабильными изотопами ^{13}C , ^{18}O или ^{15}N . Однако на настоящий момент меченные данными изотопами стандарты практически недоступны, синтезируются под конкретный заказ и их стоимость многократно превышает стоимость дейтерированных аналогов.

Приемлемой дешевой и доступной альтернативой меченым стабильным изотопом стандартам по-прежнему остаются структурно схожие аналоги аналитов. Для количественного определения ранолазина в крови методом жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии, как правило, используют немеченные соедине-

ния, такие как трамадол, арипипразол, гликлазид, фенопроламин, пропafenон, которые не являются полными структурными аналогами ранолазина и значительно отличаются от него по свойствам [1, 4, 22, 23].

В настоящем исследовании в качестве внутреннего стандарта предложено использовать карведилол. Ранолазин и карведилол имеют близкие молекулярные массы (427,5 и 406,5), характеризуются наличием ряда общих структурных элементов (азот-содержащие гетероциклы, ароматические кольца, гидроксигруппы, метоксифенок-сильные фрагменты), имеют близкие значения pK_a и $\log P$, практически равные площади молекулярной полярной поверхности $74,3 \text{ \AA}^2$ и $75,7 \text{ \AA}^2$, схожую поляризуемость $47,22 \text{ \AA}^3$ и $47,03 \text{ \AA}^3$, сопоставимое количество акцепторов водорода в молекуле: 6 и 5 соответственно [24, 25]. Обобщенные данные приведены в таблице 1.

Таблица 1. – Сравнительная характеристика ранолазина и карведилола

Ранолазин	Карведилол
$\log P$ 2,83 pK_a (Strongest Acidic) 13,6 pK_a (Strongest Basic) 7,17 Polarizability $47,22 \text{ \AA}^3$ Hydrogen Acceptor Count 6	$\log P$ 3,42 pK_a (Strongest Acidic) 14,03 pK_a (Strongest Basic) 8,74 Polarizability $45,03 \text{ \AA}^3$ Hydrogen Acceptor Count 5
	

Выбор способа пробоподготовки.

При использовании масс-спектрометрического детектирования для количественного определения аналита в биообразцах высока вероятность так называемого матричного эффекта – подавления или усиления сигнала аналита эндогенными веществами биологической матрицы, элюирующимися вместе с ним. В связи с этим, пробоподготовка образцов должна обеспечивать максимальное отделение эндогенных молекул биопробы от целевого компонента. В литературе описано применение жидкость-жидкостной экстракции (ЖЖЭ) или осаждения белка органическим растворителем для пробоподготовки биопроб, содержащих ранолазин [2, 4, 22]. Однако данные подходы не позволяют в полной мере освободить образец от фосфолипидов,

а также от продуктов разрушения эритроцитов/гемоглобина, способных повлиять на интенсивность сигнала аналита при масс-спектрометрическом детектировании. В случае пробоподготовки методом ЖЖЭ возникают проблемы со стабильностью ранолазина при упаривании полученных экстрактов [4]. Осаждение белка метанолом и ацетонитрилом снижает чувствительность анализа в результате разбавления биообразцов, что влечет за собой необходимость увеличения объема вводимой в хроматограф пробы [2, 22].

Учитывая недостатки вышеуказанных подходов, а также физико-химические характеристики аналитов, пробоподготовку биообразцов осуществляли с помощью твердофазной экстракции (ТФЭ) на гидрофобном сорбенте (Chromabond HR-X) –

сополимере полистирола и дивинилбензола. В отличие от других подходов ТФЭ не только уменьшает матричный эффект за счет эффективного удаления ряда эндогенных веществ биоматрицы, но и обеспечивает концентрирование целевых аналитов. Выделение ранолазина из слабощелочной среды (pH около 8,5) с последующим элюированием смесью 0,1М формиата аммония (pH 2,5) – метанол в объемном соотношении 20:80 обеспечивало степень извлечения аналита из сыворотки крови на уровне $96 \pm 3\%$.

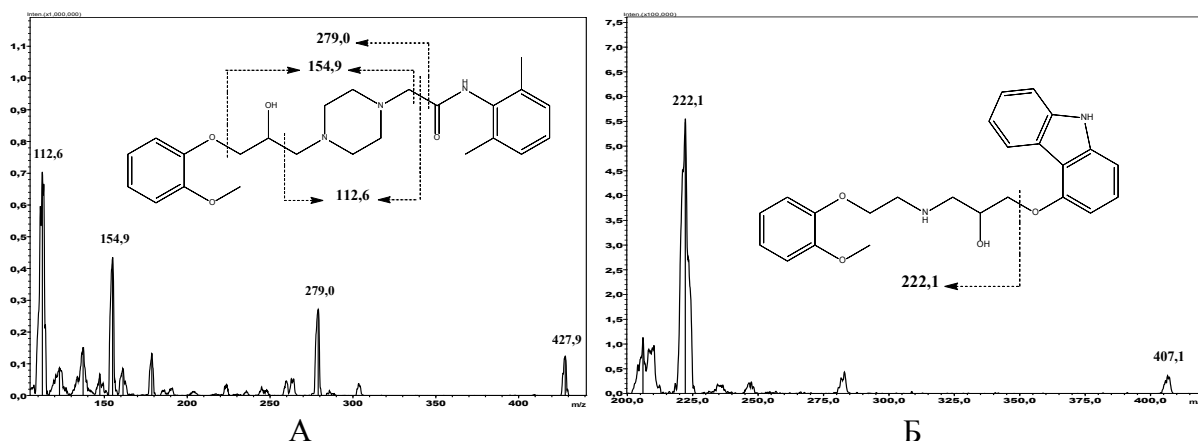
Благодаря использованной схеме ТФЭ достигалась селективность и эффективность выделения ранолазина и минимизировался эффект матрицы при последующем его масс-спектрометрическом детектировании.

Ранолазин и карведилол благодаря наличию ряда общих структурных элементов и поляризуемости характеризовались схожим хроматографическим поведением на среднеполярной цианопропильной матрице, предназначенной для разделения полярных и ненасыщенных соединений за счет дипольных и гидрофобных взаимодействий. Вместе с тем имеющиеся различия в

физико-химических свойствах ранолазина и карведилола обеспечивали полное разделение аналитов при элюировании в изократическом режиме в кислой среде.

Масс-спектрометрическое детектирование осуществляли с использованием положительной электрораспылительной ионизации в режиме мониторинга множественных реакций (MRM, Multiple Reaction Monitoring): для ранолазина m/z 427,9 \rightarrow m/z 279,0; m/z 427,9 \rightarrow m/z 154,9; m/z 427,9 \rightarrow m/z 112,6, для внутреннего стандарта (карведилол): m/z 407,1 \rightarrow m/z 222,1. Детектирование трех дочерних ионов в случае ранолазина увеличивало суммарный отклик и повышало чувствительность анализа.

Полное хроматографическое разделение ранолазина и карведилола при элюировании в изократическом режиме в кислой среде обеспечивало одинаковые условия для ионизации аналитов при масс-спектрометрическом анализе, но предотвращало эффект «насыщения ионного источника», наблюдающийся в случае совместно элюирующихся структурных аналогов или близкородственных по структуре соединений (рисунок 1).



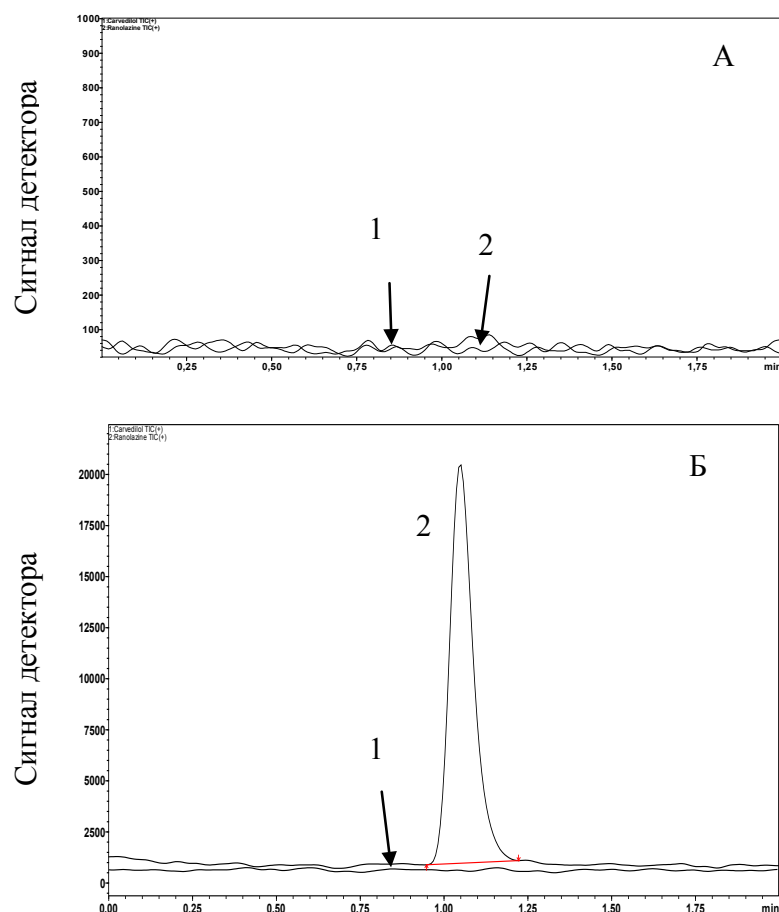
А – ранолазин, Б – карведилол

Рисунок 1. – Фрагментация (образование дочерних ионов) анализируемых веществ

Валидация методики. В соответствии с международными требованиями аттестацию методики проводили по следующим показателям: специфичность, линейный диапазон, правильность, прецизионность (повторяемость, промежуточная прецизионность), стабильность [8].

Специфичность. Для оценки селективности использованы 6 источников сыворотки крови человека, заведомо не содержащих определяемых соединений (холостой биологический образец). При анализе образцов сыворотки крови, свободной от анализируемых соединений, посторонние пики со временем удерживания ранолазина и внутреннего стандарта, которые могли бы повлиять на результаты количественного определения, не обнаружены. На рисунке 2 представлен пример типичной хроматограммы холостой пробы.

жащих определяемых соединений (холостой биологический образец). При анализе образцов сыворотки крови, свободной от анализируемых соединений, посторонние пики со временем удерживания ранолазина и внутреннего стандарта, которые могли бы повлиять на результаты количественного определения, не обнаружены. На рисунке 2 представлен пример типичной хроматограммы холостой пробы.



1 – ранолазин; 2 – внутренний стандарт (карведилол)

Рисунок 2. – Типичная хроматограмма холостого образца (А) сыворотки крови (подвергнутая пробоподготовке биоматрица, не содержащая аналита или внутреннего стандарта) и нулевого образца (Б) сыворотки крови (подвергнутая пробоподготовке биоматрица, содержащая ВС)

Перенос пробы определяли путем последовательного анализа градуировочных образцов с высокой концентрацией ранолазина и контрольных проб. На хроматограммах холостых проб, анализируемых сразу же после граду-

ировочных образцов (рисунок 3), не было обнаружено пиков со временами удерживания ранолазина и внутреннего стандарта с соотношением сигнал/шум ($S / N > 3$), что доказывает отсутствие переноса пробы.

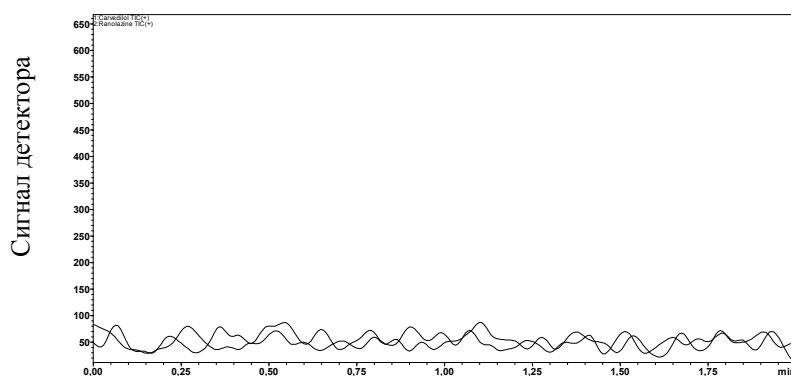
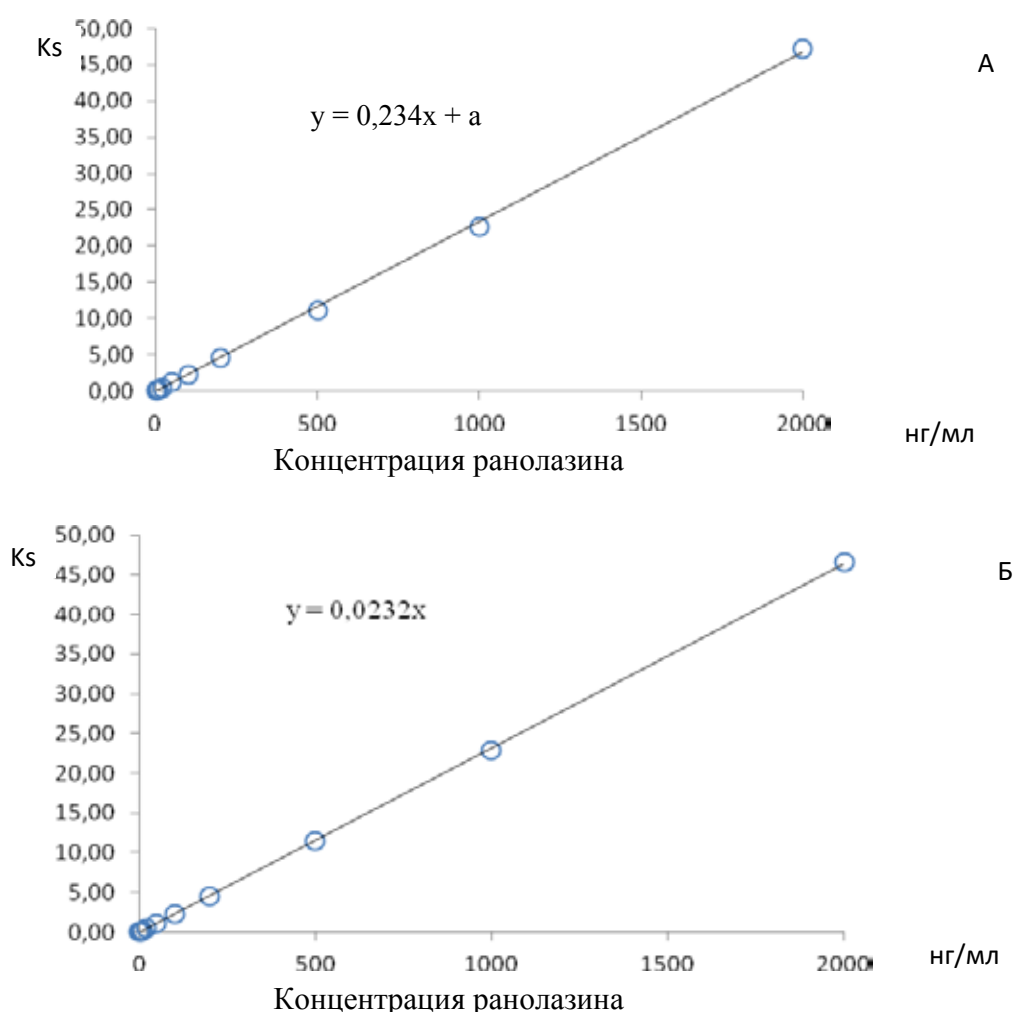


Рисунок 3. – Типичная хроматограмма холостого образца сыворотки крови сразу после анализа градуировочного образца с концентрацией ранолазина 2000 нг/мл

Эффект матрицы (ЭМ). Влияние эндогенных веществ (компонентов сыворотки крови) на процесс ионизации анализируемых веществ при масс-спектрометрии оценивали при помощи относительного показателя – эффекта матрицы (ЭМ). Величина ЭМ составляла $99 \pm 3\%$ для всех определяемых компонентов, что подтверждает минимальное влияние эндогенных веществ на процессы ионизации аналитов при масс-спектрометрии благодаря высокой степени очистки биопроб с помощью использованной схемы ТФЭ.

Отсутствие эффекта матрицы для всех уровней концентрации доказано линейностью градуировочного графика в пределах всего аналитического диапазона и низкой вариабельностью углового коэффициента линейной регрессии градуировочных графиков, полученных при использовании биологической матрицы (сыворотки) из 6 различных источников в разные дни [26, 27]. Относительное стандартное отклонение углового коэффициента b для разных биологических матриц не превышало 5%, что свидетельствует об отсутствии эффекта матрицы (рисунок 4).



А – Градуировочная зависимость внутри цикла. Б – Градуировочная зависимость, полученная с учетом данных всех градуировочных зависимостей всех приемлемых аналитических циклов ($n = 15-21$).

Рисунок 4. – Градуировочная зависимость средних значений K_s от концентрации ранолазина

Линейный диапазон. Зависимость средних значений отношения площадей пиков ранолазина и внутреннего стандарта ($y = K_s$) от концентрации ранолазина (x , нг/мл) в образце описывается уравнением линейной регрессии $y = bx + a$ с коэффициентом корреляции более 0,9993 (рисунок 4А: $r = 0,9993$; рисунок 4Б: $r = 0,9998$) для 11 уровней концентрации, проанализированных в разных аналитических циклах в разные дни в 22 повторях. Проверка статистической значимости коэффициентов уравнения регрессии с использованием t -статистики Стьюдента показала статистическую незначимость коэффициента a при вероятности $P = 95\%$, в связи с чем уравнение линейной регрессии для общей градуировочной зависимости

вида $y = bx + a$ было преобразовано в уравнение $y = bx$ с угловым коэффициентом b : $(2,32 \pm 0,03) \cdot 10^{-2}$ (рисунок 4).

Наличие «выбросов» и значимость различий для всех уровней концентрации градуировочных зависимостей всех приемлемых аналитических циклов оценивали путем сравнения экспериментальных коэффициентов Стьюдента $t_{\text{эксп}}$ с табличными значениями $t_{\text{крит}}$ при вероятности $P=95\%$.

Рассчитанные экспериментальные значения $t_{\text{эксп}}$ не превышают $t_{\text{крит}}$ для всего диапазона определяемых концентраций ранолазина, что доказывает правильность определения ранолазина в сыворотке крови на протяжении всего аналитического этапа (таблица 2).

Таблица 2. – Оценка значимости различий для градуировочных зависимостей всех приемлемых аналитических циклов (достоверность результатов определения ранолазина для всего аналитического диапазона методики)

Номинальная концентрация, нг/мл	$C_{\text{найденно}} \pm \Delta \bar{X}$, нг/мл	$t_{(\text{эксп})}$	$t_{(\text{крит})}$	Результат и вывод о соответствии критерию приемлемости
При проведении измерений в разные дни (n=15-21)				
1,00	$1,02 \pm 0,03$	1,29	2,09	$(t_{\text{эксп}} < t_{\text{крит}})$ соответствует
2,00	$1,97 \pm 0,07$	0,82	2,09	$(t_{\text{эксп}} < t_{\text{крит}})$ соответствует
5,00	$5,02 \pm 0,11$	0,41	2,09	$(t_{\text{эксп}} < t_{\text{крит}})$ соответствует
10,0	$9,8 \pm 0,2$	1,93	2,10	$(t_{\text{эксп}} < t_{\text{крит}})$ соответствует
20,0	$18,7 \pm 2,2$	1,26	2,10	$(t_{\text{эксп}} < t_{\text{крит}})$ соответствует
50,0	$50,4 \pm 1,0$	0,92	2,09	$(t_{\text{эксп}} < t_{\text{крит}})$ соответствует
100,0	$101,5 \pm 2,2$	1,42	2,09	$(t_{\text{эксп}} < t_{\text{крит}})$ соответствует
00,0	$197,7 \pm 2,3$	2,06	2,12	$(t_{\text{эксп}} < t_{\text{крит}})$ соответствует
500,0	$492,2 \pm 8,6$	1,95	2,14	$(t_{\text{эксп}} < t_{\text{крит}})$ соответствует
1000,0	$988,0 \pm 12,2$	2,10	2,12	$(t_{\text{эксп}} < t_{\text{крит}})$ соответствует
2000,0	$2005,9 \pm 31,8$	0,39	2,09	$(t_{\text{эксп}} < t_{\text{крит}})$ соответствует

Постоянство функции отклика. Полностью валидированная методика должна иметь воспроизводимые коэффициенты уравнения регрессии для градуировочной зависимости, подтверждающие постоянство функции отклика на протяжении всего периода анализа испытуемых образцов [8, 28–35].

Отсутствие постоянства функции отклика (высокая вариабельность коэффициентов уравнения регрессии) в случае ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием свидетельствует о неправильном выборе вида функции отклика, характеризующей градуировочную зависимость, указывает на наличие систематических и/или случайных ошибок при

пробоподготовке, на вариабельность концентрации внутреннего стандарта в рабочих растворах между приготовлениями. Отсутствие постоянства функции отклика может быть следствием неучтенного (некомпенсированного) эффекта матрицы, эффекта «насыщения источника ионов», а также вариабельности чувствительности методики и точности инструментального определения молекулярных масс [28–35].

В свою очередь низкая вариабельность углового коэффициента линейной регрессии градуировочных кривых, полученных при использовании биологической матрицы из различных источников, является дополнительным экспериментальным подтверждением отсутствия эффекта матри-

цы, доказывает пригодность внутреннего стандарта и может свидетельствовать о незначительности вклада неопределенности, привносимой биологической матрицей в результаты измерения [26, 27].

Для математической оценки пригодности уравнения регрессии градуировочной зависимости для определения концентрации ранолазина в испытуемых образцах

на протяжении всего аналитического этапа рассчитывали относительное стандартное отклонение углового коэффициента. Установлено, что относительное стандартное отклонение углового коэффициента b уравнения регрессии градуировочных зависимостей для ранолазина в разные дни в разных аналитических циклах составляет 3,1% (рисунок 5).

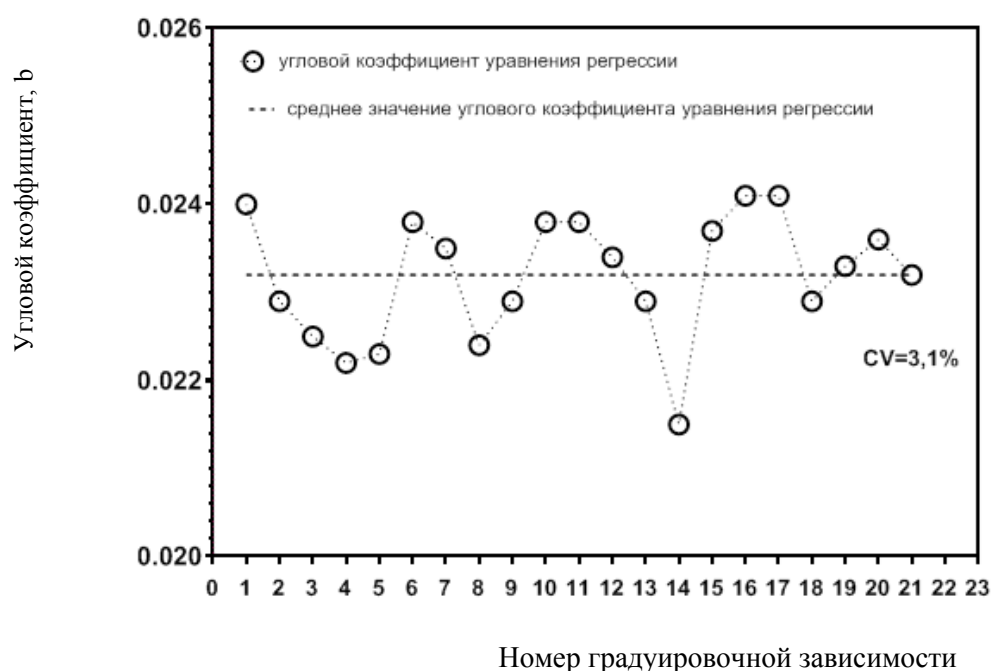


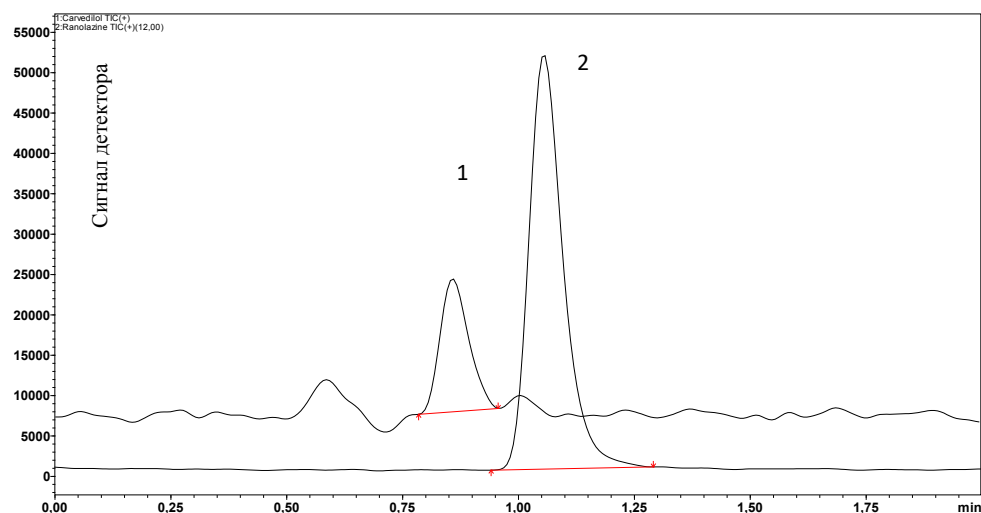
Рисунок 5. – Воспроизводимость углового коэффициента b уравнения регрессии градуировочных зависимостей в разные дни для всех приемлемых аналитических циклов

Таким образом, для углового коэффициента b доказана низкая вариабельность ($S_r < 5,0\%$) в разных аналитических циклах, что подтверждает постоянство функции отклика для градуировочной зависимости на протяжении всего периода анализа испытуемых образцов и, соответственно, высокую прецизионность методики в целом.

Для подтверждения пригодности усредненной регрессионной модели $y = 0,0232x$ проводили дисперсионный анализ с использованием F-теста для оценки различий между наилучшим значением (best-fit value) углового коэффициента уравнения регрессии для каждой индивидуальной градуировочной зависимости $y = b_m x$ и угловым коэффициентом уравнения регрессии для усредненной зависимости $y = 0,0232x$, полученной при регрессионном анализе данных всех приемлемых повторов всех приемлемых аналитических циклов.

За нулевую гипотезу принималось отсутствие различий ($H_0: b_1 \dots b_{21} = b_h$), в качестве альтернативной гипотезы рассматривалось утверждение, что наилучшие значения угловых коэффициентов уравнения регрессии для каждой индивидуальной градуировочной зависимости (m) значительно отличаются от гипотетического значения углового коэффициента b_h ($H_1: b_1 \dots b_{21} \neq b_h$) для усредненной градуировочной зависимости.

Проверка гипотез с помощью двустороннего теста значимости показала, что рассчитанное значение $P = 0,8014$ превышает 0,05, в соответствии с чем нулевая гипотеза не отвергается. Таким образом установлено, что при заданном уровне значимости 0,05 для каждого индивидуального комплекта (m) градуировочной зависимости наилучшее значение углового коэффициента (b_m) не отличается от гипотетического значения b_h .



1 – ранолазин; 2 – внутренний стандарт (карведилол)

Рисунок 6. – Типичная хроматограмма градуировочного раствора (сыворотка крови) с концентрацией ранолазина 1,0 нг/мл

тетического значения углового коэффициента $b_h = 0,0232$ для усредненной регрессионной модели.

Нижний предел количественного определения ранолазина составил 1,0 нг/мл при относительном стандартном отклонении в разные дни 6,6% ($n = 21$). Процентная мера правильности определения ранолазина (1,0 нг/мл) составила 102%, что полностью соответствует критерию приемлемости.

Повторяемость и прецизионность. Прецизионность внутри цикла оценивалась по величине относительного стандартного отклонения (S_r) для всех уровней

концентраций образцов для контроля качества испытания.

Результаты оценки правильности и прецизионности методом «добавлено-найденно» представлены в таблице 3.

Повторяемость, оцененная по значениям относительного стандартного отклонения, для образцов для контроля качества испытания внутри одного цикла составляет $S_r = 4,8–8,2\%$; значения ϵ находятся в пределах 5,1–8,6%, что полностью соответствует критериям приемлемости (величины S_r и ϵ не более 15% для всех уровней концентрации образцов (для НПКО не более 20%)) [7, 8].

Таблица 3. – Оценка правильности и прецизионности количественного определения ранолазина в образцах для контроля качества испытания

$C_{\text{добавлено, нг/мл}}$	$C_{\text{найденно}} \pm \Delta \bar{X}, \text{ нг/мл}$	Правильность (R, %)	Относительная величина систематической погрешности (δ , %)	Прецизионность (S_r , %)	Относительная ошибка (ϵ , %)
Один день (внутри цикла, $n=6$)					
1,50	$1,48 \pm 0,10$	99	-1,1	6,2	6,5
15,0	$14,7 \pm 1,3$	98	-1,7	8,2	8,6
150,0	$146,2 \pm 7,7$	97	-2,5	5,0	5,3
1300,0	$1288,7 \pm 65,1$	99	-0,9	4,8	5,1
Разные дни (между циклами, $n=91-97$)					
1,50	$1,51 \pm 0,03$	101	0,7	8,1	1,7
15,0	$14,8 \pm 0,1$	98	-1,5	4,0	0,8
150,0	$148,0 \pm 0,9$	99	-1,4	3,1	0,6
1300,0	$1307,5 \pm 11,2$	101	0,6	4,2	0,9

Промежуточная прецизионность, оцененная по значениям относительного стандартного отклонения, для образцов для контроля качества испытания между циклами составляет $S_r = 3,1-8,1\%$; значения ϵ находятся в пределах $0,6-1,7\%$, что полностью соответствует критериям приемлемости (величины S_r и ϵ не более 15% для всех уровней концентрации образцов (для НПКО не более 20%)) [7, 8].

Стабильность ранолазина в образцах для контроля качества испытания изучали в условиях трехкратной заморозки/разморозки, при хранении размороженных образцов при комнатной температуре до пробоподготовки, при хранении подготовленных образцов при $+4^\circ\text{C}$ в автосамплере, а также в условиях долгосрочного хранения замороженных образцов (таблица 4).

Таблица 4. – Оценка стабильности ранолазина в образцах для контроля качества испытания

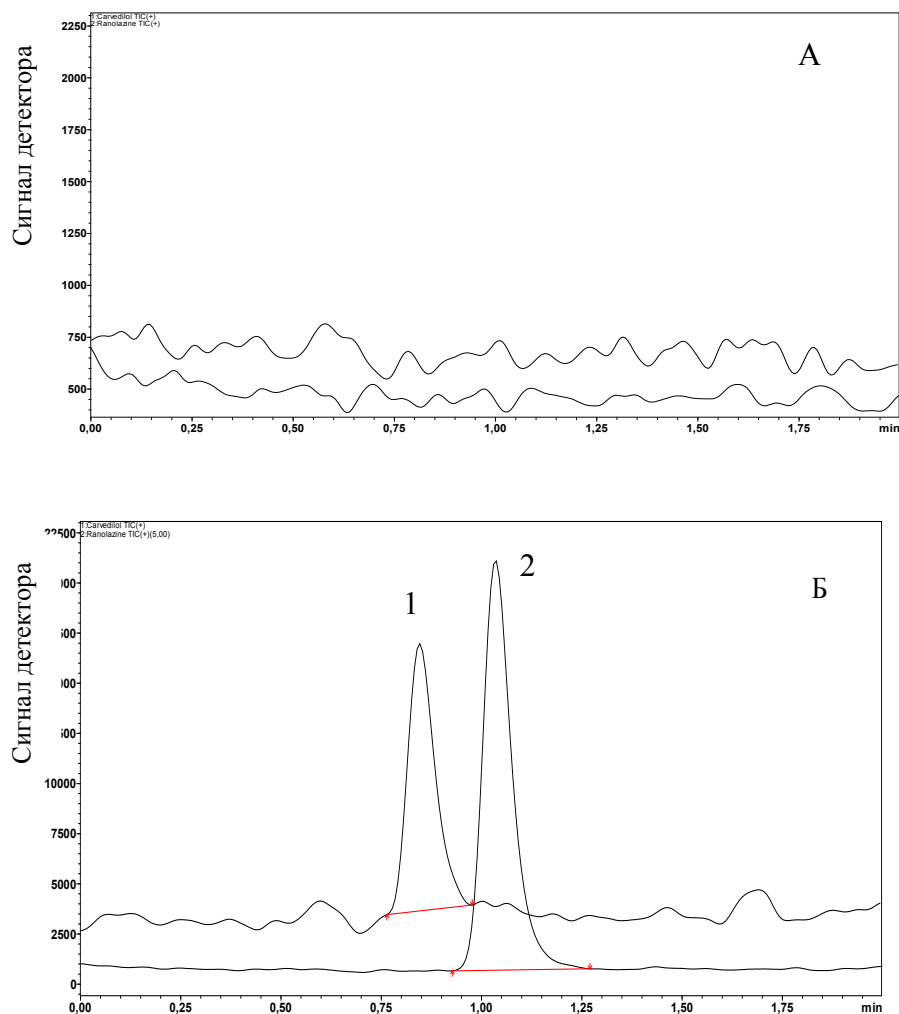
$C_{\text{добавлено,}} \text{ нг/мл}$	$C_{\text{найденно}} \pm \Delta \bar{X}, \text{ нг/мл}$	Правильность (R, %)	Относительная величина систематической погрешности (δ , %)	Прецизионность (S_r , %)	Относительная ошибка (ϵ , %)
Краткосрочное хранение после размораживания (8 часов при $+22^\circ\text{C}$)					
1,50	$1,47 \pm 0,14$	98	-1,9	7,8	9,7
15,0	$14,6 \pm 0,8$	97	-2,8	4,3	5,3
150,0	$148,1 \pm 5,4$	99	-1,3	2,9	3,6
1300,0	$1316,3 \pm 44,8$	101	1,3	2,7	3,4
Долгосрочное хранение замороженных образцов (около 79 суток)					
1,50	$1,54 \pm 0,08$	103	2,6	5,3	5,5
15,0	$15,2 \pm 0,6$	102	1,6	3,7	3,9
150,0	$149,7 \pm 8,9$	100	-0,2	5,7	5,9
1300,0	$1309,5 \pm 50,0$	101	0,7	3,6	3,8
Размораживание/замораживание (3 цикла)					
1,50	$1,59 \pm 0,10$	106	6,6	5,7	6,3
15,0	$14,8 \pm 1,2$	98	-0,8	-1,6	8,4
150,0	$142,4 \pm 8,8$	95	-4,2	-5,1	6,2
1300,0	$1329,0 \pm 75,2$	102	3,1	2,2	5,7
Хранение подготовленных образцов при $+4^\circ\text{C}$ – 48 часов					
1,50	$1,58 \pm 0,15$	105	5,3	7,4	9,2
15,0	$14,7 \pm 0,9$	98	-1,9	4,7	5,9
150,0	$148,6 \pm 5,9$	99	-0,9	3,2	4,0
1300,0	$1349,0 \pm 63,9$	104	3,8	3,8	4,7

Из таблицы 4 видно, что для четырех уровней концентрации ранолазина все полученные результаты соответствуют критериям приемлемости. Таким образом, условия хранения биопроб, а также способ пробоподготовки обеспечивают надлежащую сохранность анализируемого вещества.

Фармакокинетические профили. Разработанная методика использована при оценке сравнительной биодоступности генерического лекарственного средства Ранолазин-НАН, таблетки пролонгированного действия, 500 мг по отношению к оригинальному лекарственному средству (Ранекса, таблетки пролонгированного действия, 500 мг, производства Menarini International Operating Luxembourg S. A., Люксембург). На рисунке 7

представлена демонстрационная хроматограмма образца сыворотки крови добровольца через 36 часов после перорального приема натошак 500 мг ранолазина. Сравнительная фармакокинетическая зависимость концентрации ранолазина в крови от времени после приема одной таблетки генерического ЛС и оригинального ЛС приведена на рисунке 8. Разработанная методика позволяет достоверно измерять концентрации ранолазина в сыворотке крови в течение 36 ч.

Применение карведилола в качестве альтернативы дорогостоящим и малодоступным меченным внутренним стандартам позволяет снизить себестоимость количественного определения ранолазина при проведении масштабных биоэквивалентных испытаний.



1 – ранолазин; 2 – внутренний стандарт

Рисунок 7. – Демонстрационная хроматограмма образца сыворотки крови добровольца до (А) и через 36 часов (Б) после перорального приема натошак 500 мг ранолазина

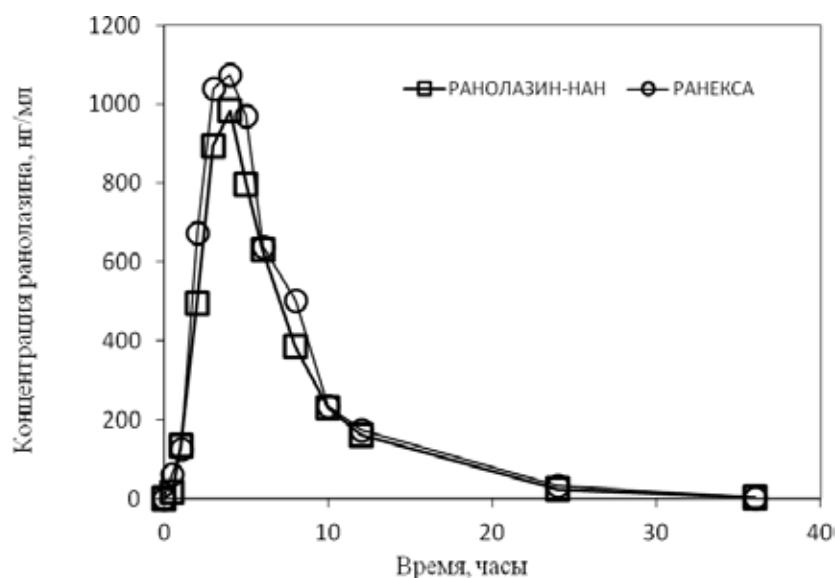


Рисунок 8. – Зависимость концентрации ранолазина в сыворотке крови здорового добровольца Д-11 от времени после приема однократной дозы ЛС Ранолазин-НАН и оригинального ЛС Ранекса

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые разработана и валидирована в соответствии с международными требованиями методика хромато-масс-спектрометрического определения ранолазина в сыворотке крови. Для пробоподготовки использована твердофазная экстракция на гидрофобном сополимере полистирола и дивинилбензола. Последующее хроматографическое разделение экстрагированных аналитов осуществляли на колонке со среднеполярной фазой на основе химически модифицированного кремнезема с привитыми цианоалкильными группами. Сочетание в методике различных механизмов сорбции аналитов при пробоподготовке и при хроматографии обеспечило высокую селективность и чувствительность анализа. Впервые предложено использовать в качестве внутреннего стандарта карведилол, который, благодаря наличию ряда общих с ранолазином структурных элементов и сходству физико-химических свойств, обеспечивает высокую воспроизводимость и надежность разработанной методики при анализе большого количества биообразцов. Методика успешно апробирована при исследовании сравнительной биодоступности лекарственных средств, содержащих ранолазин.

SUMMARY

I. V. Semak, V. B. Klimashevich,
E. V. Malyushkova, E. O. Korik,
O. A. Kazyuchits, A. I. Zhebentyaev
DEVELOPMENT AND VALIDATION
OF THE ASSAY METHOD
FOR RANOLASIN IN HUMAN BLOOD
SERUM FOR PHARMACOKINETIC
STUDIES

A method for chromatography-mass spectrometric determination of ranolazine in blood serum has been developed using solid-phase extraction for sample preparation on hydrophobic polystyrene and divinylbenzene copolymer (Chromabond HR-X) followed by chromatographic separation of the extracted analytes on the column with a mid-polar phase based on chemically modified cyanoalkyl-embedded silica (Nucleodur-100-3 CN-RP). Due to the proposed solid phase extraction scheme, selectivity and efficiency of ranolazine isolation were achieved and matrix

effect was minimized during its subsequent mass spectrometric detection. Various mechanisms combination of analytes sorption in the technique during sample preparation and chromatography performance provided high selectivity and sensitivity of analysis. For the first time carvedilol was proposed to be used as an internal standard which, due to the presence of a number of common structural elements and similarity of physicochemical properties, ensures high reproducibility and reliability of the developed technique when analyzing a large number of biosamples. The use of carvedilol as an alternative to expensive and inaccessible labeled internal standards allows to reduce the cost of ranolazine assay during large-scale bioequivalent studies. The methodology is validated in accordance with international requirements and has been successfully tested in the study of comparative bioavailability of the drugs containing ranolazine.

Keywords: ranolazine, solid phase extraction, chromatography-mass spectrometric determination, validation.

ЛИТЕРАТУРА

1. Development and validation of sensitive U-HPLC-MS/MS method with electrospray ionization for quantitation of ranolazine in human plasma: application to a clinical pharmacokinetic study / Qin-You Tan [et al.] // Journal of chromatography B. – 2012. – № 901. – P. 119–124.
2. Development and validation of sensitive LC-MS/MS assay for simultaneous quantitation of ranolazine and its three metabolites in human plasma / Yuan Wang [et al.] // Journal of chromatography B. – 2012. – № 889–890. – P. 10–16.
3. Enantioselective analysis of ranolazine and desmethyl ranolazine in microsomal medium using despersible liquid-liquid microextraction and LC-MS/MS / R. Almeida [et al.] // Bioanalysis. – 2013. – V. 5, № 2. – P. 171–183.
4. Determination of ranolazine in human plasma by liquid chromatographic-tandem mass spectrometric assay / Limei Zhao [et al.] // Journal of chromatographic science. – 2008. – Vol. 46. – P. 1404–1410.
5. White paper on recent issues in regulated bioanalysis from e³rd calibration and validation group workshop / N. Savoie [et al.] // Bioanalysis. – 2010. – V. 2, № 1. – P. 53–68.

6. Handbook of LC-MS Bioanalysis: Best Practices, Experimental Protocols, and Regulations / Wenkui Li [et al.]. – USA: Wiley, 2013. – 704 p.
7. ICH harmonised guideline bioanalytical method validation M10 [Electronic resource] / European Medicines Agency. – London 2019. – Mode of access: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/draft-ich-guideline-m10-bioanalytical-method-validation-step-2b_en.pdf. – Date of access: 08.09.2019.
8. Правила проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза: Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г., № 85 [Электронный ресурс] / Европейская экономическая комиссия. – Астана, 2016. – Режим доступа: https://docs.eaeunion.org/docs/ru-ru/01411942/cncd_21112016_85. – Дата доступа: 07.05.2019.
9. Guidelines for calibration in analytical chemistry. Part 1. Fundamentals and single component calibration (IUPAC Recommendations 1998) / K. Danzer [et al.] // Pure and Applied Chemistry. – 1998. – V. 70, № 4. – P. 993–1014.
10. Guidelines for calibration in analytical chemistry. Part 2. Multispecies calibration (IUPAC technical report) / K. Danzer [et al.] // Pure and Applied Chemistry. – 2004. – V. 76, № 6. – P. 1215–1225.
11. Rebane, Riin. Matrix interference in LC-ESI-MS/MS analysis of metanephries in protein precipitated plasma samples / R. Rebane, K. Herodes // European journal of mass spectrometry. – 2019. – Vol. 26, № 1. – P. 1–9.
12. Do deuterium labeled internal standards correct for matrix effects in LC-MS/MS assays? A case study using plasma free metanephrene / D. Bunch // Clinica chimica acta. – 2014. – № 429. – P. 4–5.
13. Development and validation of a liquid chromatographic-tandem mass spectrometric method for determination of piperazine in plasma. Stable isotope labeled internal standard does not always compensate for matrix effects / N. Lindegardh [et al.] // Journal of chromatography B. – 2008. – № 862. – P. 227–236.
14. Does a stable isotopically labeled internal standard always correct analyte response? A matrix effect study on a LC/MS/MS method for the determination of carvedilol enantiomers in human plasma / Sh. Wang [et al.] // Journal of pharmaceutical and biomedical analysis. – 2007. – № 43. – P. 701–707.
15. Stable isotopically labeled internal standards in quantitative bioanalysis using liquid chromatography/mass spectrometry: necessity or not? / E. Stokvis [et al.] // Rapid communications in mass spectrometry. – 2005. – № 19. – P. 401–407.
16. Liquid chromatography/tandem mass spectrometry methods for quantitation of mevalonic acid in human plasma and urine: method validation, demonstration of using a surrogate analyte, and demonstration of unacceptable matrix effect in spite of use of a stable isotope analog internal standard / M. Jemal [et al.] // Rapid communications in mass spectrometry. – 2003. – № 17. – P. 1723–1734.
17. Internal standard signal suppression by co-eluting analyte in isotope dilution LC-ESI-MS / L. Sojo [et al.] // The analyst. – 2003. – № 128. – P. 51–54.
18. Ionization enhancement in atmospheric pressure chemical ionization between target drugs and stable-isotope-labeled internal standards in quantitative liquid chromatography/tandem mass spectrometry / H. R. Liang [et al.] // Rapid communications in mass spectrometry. – 2003. – № 17. – P. 2815–2821.
19. Potential problems with using deuterated internal standards for liquid chromatography-tandem mass spectrometry / A. S. Davison [et al.] // Annals of clinical biochemistry. – 2013. – № 50. – P. 274.
20. LC-MS-MS experiences with internal standards / J. Wieling [et al.] // Annals of clinical biochemistry. – 2002. – № 55. – P. 107–113.
21. Systematic evaluation of the root cause of non-linearity in liquid chromatography/tandem mass spectrometry bioanalytical assays and strategy to predict and extend the linear standard curve range / Long Yuan [et al.] // Rapid communications in mass spectroscopy. – 2012. – № 26. – P. 1465–1474.
22. Determination of Ranolazine in human plasma by LC-MS/MS and its application in bioequivalence study / Uttam Bhaumik [et al.] // Journal of pharmaceutical and biomedical analysis. – 2008. – № 48. – P. 1404–1410.
23. Bioequivalence and Pharmacokinetic Study of Ranolazine in Healthy Male Volunteers: An Open label, Randomized, Single-Dose, Two-Way Crossover Study / Suresh VV

Babu [et al.] // *Pharmatutor*. – 2015. – Vol. 3, № 5. – P. 24–28.

24. Ranolazine // Drugbank [Electronic resource]. – 2005. – Mode of access: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00243>. – Date of access: 10.01.2018.

25. Carvedilol // Drugbank [Electronic resource]. – 2005. – Mode of access: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00243>. – Date of access: 11.01.2018.

26. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS / B. K. Matuszewski [et al.] // *Analytical chemistry*. – 2003. – Vol. 75, № 3. – P. 3019–3030.

17. Standard line slopes as a measure of a relative matrix effect in quantitative HPLC-MS bioanalysis / B. K. Matuszewski [et al.] // *Journal of chromatography B*. – 2006. – № 830. – P. 293–300.

28. Moosavi, S. Linearity of calibration curves for analytical methods: a review of criteria for assessment of method reliability / S. Moosavi, S. Ghassabian // *Calibration and validation of analytical methods: a sampling of current approaches* / Edited by Mark T. Stauffer. – IntechOpen, 2018. – Chapt. 6. – P. 109–127.

29. Masson, P. Quality control techniques for routine analysis with liquid chromatography in laboratories/ P. Masson // *Journal of chromatography A*. – 2007. – № 1158. – P. 168–173.

30. Recommendations and best practices

for calibration curves in quantitative LC-MS bioanalysis / Y. Fu [et al.] // *Bioanalysis*. – 2019. – V. 11, № 15. – P. 1375–1377.

31. Reasons for calibration standard curve slope variation in LC-MS assays and how to address it / Yue Zhao [et al.] // *Bioanalysis*. – 2014. – V. 6, № 11. – P. 1439–1443.

32. White paper on recent issues in regulated bioanalysis: focus on new technologies and biomarkers (Part 1 – small molecules by LCMS) / J. Welink [et al.] // *Bioanalysis*. – 2015. – V. 7, № 22. – P. 2913–2925.

33. White paper on recent issues in bioanalysis and regulatory findings from audits and inspections / F. Garofolo [et al.] // *Bioanalysis*. – 2011. – V. 3, № 18. – P. 2081–2096.

34. Better calibration and outlier detection for high-throughput mass spectrometry / A. Zabell [et al.] // *Clinical mass spectrometry*. – 2016. – № 2. – P. 25–33.

35. Raposo, F. Evaluation of analytical calibration based on least-squares linear regression for instrumental techniques: a tutorial review / F. Raposo // *Trends in analytical chemistry*. – 2016. – № 77. – P. 167–185.

Адрес для корреспонденции:

220141, Республика Беларусь,
г. Минск, ул. академика В. Ф. Купровича, д. 5, к. 3,
Республиканское производственное
унитарное предприятие «АКАДЕМФАРМ»,
тел/факс: +375(17)268 63 64,
e-mail: alkiona9@mail.ru,
Климашевич В. Б.

Поступила 16.09.2020 г.